Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 15, No. 1, Spring 2023, p. 51-63

The Effect of Chemical Buffering and Microbial Additives on Histomorphometry and Histopathology of the Small and Large Intestine of Lambs Fed High Concentrate Diets

Freshteh Vafaee[1], Morteza Chaji[2*], Omid Khorasani[3], Farshad Baghban[4]

Received: 02-09-2021
Revised: 07-06-2022
Accepted: 01-08-2022
Available Online: 01-08-2022

How to cite this article:
Vafaee, F., Chaji, M., Khorasani, O., & Baghban, F. (2023). The effect of chemical buffering and microbial additives on histomorphometry and histopathology of the small and large intestine of lambs fed high concentrate diets. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(1), 51-63.
DOI: 10.22067/ijasr.2022.73983.1057

Introduction: Intestinal function in nutrient uptake depends on its morphology, and any change in villi structure, as well as changes in the differentiation and development of absorbent cells, can alter digestion and absorption capacity and thus function. Increasing the height and surface of Villus in the gastrointestinal tract of animals consuming high concentrates increases the absorption capacity and in turn, protects the animal from the accumulation of volatile fatty acids and a noticeable decrease in pH. In fact, it helps the lining of the gastrointestinal tract absorb volatile fatty acids faster and stabilize the pH. High starch in diets, followed by a decrease in pH, affects the morphology of the rumen and intestine. Any change in this morphology may predispose the intestines to dysfunction. *Megasphaera elsdenii* prevents a sharp decrease in ruminal pH due to lactic acid accumulation by consuming lactic acid, and in cases of subacute acidosis by converting lactic acid to propionic acid may provide an opportunity to reduce inflammation and improve energy balance in livestock. Saccharomyces cerevisiae also contributes to the growth and activity of cellulose-degrading bacteria, lactate consuming bacteria, and rumen protozoa and the concomitant use of lactate consuming bacteria with Saccharomyces cerevisiae has been confirmed. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of chemical and microbial buffer additives on histomorphometry and histopathology of the small intestine and large intestine during high concentrate feeding.

Materials and Methods: Twelve Arabi male sheep at 9 ± 1 months old and initial body weight of 35.95±3.55 kg were used in a completely randomized design with three treatments and four replicates, and the duration of the experiment was 35 days. The experimental treatments consisted of a 1- control diet, 2- control diet + sodium bicarbonate buffer, 3- control diet + Megasphaera elsdenii, and Saccharomyces cerevisiae (bacterial-yeast), which fed *ad libitum*. At the end of the experiment, the lambs were slaughtered and the small and large intestines were sampled for histomorphometry and histopathology studies. Each sample was placed separately in closed-sealed containers containing 10% formalin, and tissue changes were examined microscopically.

Results and Discussion: No significant difference was observed between the experimental treatments for the tissue indices studied in the duodenum and jejunum. However, the ratio of villus height to crypt depth in the bacterium-yeast recipient treatment was numerically higher than other treatments. In ileum section, villi height, crypt depth and villi area in control treatment 653.33; 506.67; 258.42 compared to buffer treatment 430.00; 328.33; 161.40 and treatment containing bacterial-yeast 445.00; 365.00; 178.04 respectively were significantly higher (P <0.05). In the present experiment, due to the consumption of a diet with high concentrate and possibly increased

1- Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
3- Ph.D. of Animal Nutrition, Kharazmi Industrial School, of Dezful, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Azad University of Yasoj, Yasij, Iran.
*Corresponding Author's Email: chaji@asnrukh.ac.ir

production of volatile fatty acids in the rumen and their transfer to later parts of the gastrointestinal tract, increased villi height, crypt depth, and villi area in different parts Intestine was observed especially in control treatment; In fact, one of the reasons for increasing the villi height and Villus surface in acidosis, is increased the absorption capacity of volatile fatty acids and help maintain pH of the rumen, Therefore, reducing these indices in chemical buffer and bacterial-yeast treatments can be the result of the positive effects of buffer and microbial additives such as improving the pH of ruminal fluid transferred to different parts of the intestine, as a result of increased activity of cellulolytic bacteria and more acetate production, which has caused relative control of acidosis in the control treatment. Improving the Villus height to crypt depth ratio in the duodenum and jejunum in treatments receiving chemical or microbial additives can be considered as positive results of using pH-adjusting additives in the present experiment. In different parts of the small intestine, in all three treatments, inflammation of the intestinal mucosa was observed in the form of infiltration of mononuclear inflammatory cells, including lymphocytes, plasma cells with different degrees of eosinophils. In the large intestine in the control treatment, hyperemia, the infiltration of inflammatory cells of lymphocytes, plasma cells, and eosinophils in small numbers in Lamina propria and labyrinth of Lieberkohen glands as well as necrosis of the villi was observed. In general, changes in intestinal tissues are to counteract the inflammation caused by acidosis.

Conclusion: In general, although the use of chemical buffering or microbial additives had a positive effect on the histomorphometry of the ileum, but did not have a positive effect on the histopathology of the small and large intestine. It is suggested that the present experiment be examined in the early stages of livestock growth when the microbial flora is not fully established.

Keywords: Acidosis, Buffer, Megasphaera elsdenii, Saccharomyces cerevisiae, Tissue.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

جلد۱۵، شماره۱، بهار۱۴۰۲، ص ٦٣-٥١

تأثیر استفاده از افزودنی‌های بافری شیمیایی و میکروبی بر هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی روده کوچک و بزرگ بره‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی کنسانتره زیاد

فرشته وفایی[۱]، مرتضی چاجی[۲]*، امید خراسانی[۳] و فرشاد باغبان[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۰

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر بافرهای شیمیایی و میکروبی بر ویژگی‌های بافت شناسی روده کوچک و روده بزرگ در حین تغذیه کنسانتره زیاد انجام گرفت. از ۱۸ رأس بره نر عربی ۱ ± ۹ ماه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره شاهد (فاقد افزودنی)، ۲- شاهد + یک درصد بافر بی‌کربنات سدیم، ۳- شاهد + سه میلی‌لیتر باکتری *مگاسفرا السدنی* و دو گرم مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* برای هر دام (باکتری- مخمر) بودند. در پایان آزمایش بره‌ها کشتار شدند و برای مطالعات هیستومورفومتری (طول، عمق، عرض پرز و ضخامت لایه عضلانی) و هیستوپاتولوژی از روده کوچک و بزرگ نمونه‌گیری شد. در بخش دوئودونوم و ژژنوم نسبت ارتفاع به عمق کریپت در تیمار دریافت‌کننده باکتری- مخمر از نظر عددی نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. در بخش ایلئوم به‌ترتیب ارتفاع پرز، عمق کریپت و مساحت پرز در شاهد (۶۵۳/۳۳، ۵۰۶/۶۷، ۲۵۸/۴۲ میکرون) نسبت به تیمار بافر (۴۳۰، ۳۲۸/۳۳، ۱۶۱/۴۰ میکرون) و تیمار حاوی باکتری- مخمر (۴۴۵، ۳۶۵، ۱۷۸/۰۴ میکرون) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). در بخش‌های مختلف روده کوچک در هر سه تیمار التهاب مخاط روده به شکل نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اعم از لنفوسیت، پلاسماسل با درجات متفاوت ائوزینوفیل مشاهده شد. در مجموع، استفاده از افزودنی‌های بافری شیمیایی و یا میکروبی تأثیر مثبتی بر هیستومورفومتری بافت ایلئوم داشت، امّا تأثیر مثبتی بر هیستوپاتولوژی بافت‌های روده کوچک و بزرگ نداشت و بین اثرات تیمار حاوی بافر بیکربنات با تیمار باکتری- مخمر نیز تفاوتی مشاهده نشد.

واژهای کلیدی: اسیدوز، بافت، بافر، *ساکارومایسیس سرویسیه*، *مگاسفرا السدنی*

مقدمه

روده باریک به‌عنوان بخشی از دستگاه گوارش حیوانات نقش مهمی در تکمیل هضم و جذب مواد مغذی و ترشح برخی هورمون‌ها دارد. وجود انواع پرزها از نظر شکل و ابعاد و ریز پرزها در روده، موجب افزایش سطح و در نتیجه، افزایش بازده آن در هضم و جذب مواد مغذی می شود (Afzalzadeh *et al*., 2013). بنابراین، عملکرد روده در جذب مواد مغذی به مورفولوژی آن وابسته است و هر گونه تغییر در ساختمان پرزها و همچنین تغییر در تمایز و نمو سلول‌های جاذب می‌تواند ظرفیت هضم و جذب و در نتیجه، عملکرد را تغییر دهد. ارتفاع پرزها و عمق کریپت و نسبت ارتفاع به عمق کریپت نمایانگر محیط روده بوده و می‌تواند به‌عنوان شاخص سلامتی روده در نظر

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز- ملاثانی، ایران.
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز- ملاثانی، ایران.
۳- دکتری تغذیه دام، هنرستان خوارزمی دزفول، دزفول، ایران.
۴- استادیار گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج، یاسوج، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: chaji@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2022.73983.1057

گرفته شود (Wang *et al*., 2009). افزایش ارتفاع و سطح پرزهای دستگاه گوارش دام مصرف‌کننده کنسانتره زیاد باعث افزایش ظرفیت جذب می شود و به نوبه خود حیوان را از تجمع اسیدهای چرب فرار و کاهش محسوس pH محافظت می‌کند؛ و در واقع به بافت پوششی دستگاه گوارش در جذب سریع‌تر اسیدهای چرب فرار و ثبات pH کمک می کند (Krause and Oetzel, 2006; Wang *et al*., 2009).

به طور معمول جیره‌های غذایی با نشاسته زیاد اغلب برای بهبود عملکرد رشد یا تولید شیر در نشخوارکنندگان استفاده می‌شود و سطح نشاسته جیره معمولاً بیش از ۳۵ درصد توصیه شده است (Wang *et al*., 2009). نشاسته زیاد در جیره‌های غذایی و در پی آن کاهش pH، بر مورفولوژی شکمبه و روده تأثیر می‌گذارد؛ از آنجایی که عملکرد جذبی روده به ریخت شناسی آن مربوط است؛ هرگونه تغییر در این مورفولوژی ممکن است روده را مستعد ایجاد اختلال در عملکرد آن کند (Wang *et al*., 2009). اصولاً تشخیص اسیدوز شکمبه و در نتیجه، درمان آن دشوار است و در بیشتر موارد، درمان چندان مؤثر نیست و به‌طور کلی، اساس بر پیشگیری است که اقدامات پیشگیرانه باید مبتنی بر مدیریت تغذیه باشد (Li *et al*., 2011).

مگاسفرا السدنی و *سلنوموناس رومینانتیوم* سویه های غالب باکتری‌های مصرف‌کننده اسید لاکتیک در شکمبه هستند و از بین این دو سویه *مگاسفرا السدنی* ۶۵ تا ۹۵ درصد لاکتات موجود در شکمبه را مصرف می‌کند. بنابراین، *مگاسفرا السدنی* با مصرف اسید لاکتیک از کاهش شدید pH شکمبه در نتیجه، تجمع اسید لاکتیک جلوگیری می کند (Prabhu *et al*., 2012; Khorasani *et al*., 2020) و در شرایط اسیدوز تحت حاد با تبدیل اسید لاکتیک به اسید پروپیونیک ممکن است (Stone, 2004; Khorasani *et al*., 2020) فرصتی برای کاهش التهاب و بهبود تعادل انرژی در دام ایجاد کند (Steele *et al*., 2016). مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* نیز به رشد و فعالیت باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز، باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات (*مگا سفرا السدنی* و *سلنوموناس رومینانتیوم*) و پروتوزوآهای شکمبه کمک می‌کند و استفاده توأم باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات با مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* نیز تأیید شده است (Pinloche *et al*., 2013; Khorasani *et al*., 2020).

استفاده از بافر بی کربنات سدیم در جیره دام‌ها نیز از راه‌های مختلف، آسیب‌های حاصل از بروز اسیدوز حاد و تحت حاد شکمبه‌ای را برطرف کرده و یا کاهش می‌دهد (Erdman *et al*., 1980; Khorasani *et al*., 2021). از طرفی، استفاده از مخمر و ترکیبات فعال زیستی نظیر باکتری‌های مصرف‌کننده اسید لاکتیک نظیر بافرهای شیمیایی نیز می‌توانند در کاهش التهاب ناشی از اسیدوز مؤثر باشند و تأثیر آن‌ها با این بافرها قابل مقایسه و رقابت است (Aschenbach *et al*., 2019; Khorasani *et al*., 2021). در آزمایشی استفاده از تیمارهای حاوی تنظیم‌کننده pH، به‌دلیل کنترل نسبی اسیدوز، افزایش فعالیت باکتری‌های سلولولیتیک و افزایش تولید استات، باعث شد که افزایش ارتفاع پرز ناحیه شکمی شکمبه در تیمارهای مصرف‌کننده بافر بیکربنات و باکتری *مگاسفرا السدنی*- مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* از شاهد کمتر باشد (Khorasani *et al*., 2021). در پژوهشی، با بره‌های پرواری دریافت‌کننده مخلوط باکتری *مگاسفرا السدنی* و مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* (باکتری- مخمر) در جیره، وجود نقش مؤثر هم‌افزایی باکتری- مخمر در ابتدای دوره و ۲۱ روز ابتدای آزمایش بر عملکرد دام مشخص شد؛ از آنجایی که در این بازه، ریزجانداران شکمبه حیوانات هنوز به تغییرات جیره عادت نکرده‌اند، استفاده از افزودنی باکتری- مخمر می‌تواند به‌عنوان یک بافر یا تنظیم‌کننده pH مؤثر باشد (Khorasani *et al*., 2020).

بررسی‌ها نشان داد که تحقیقات قبلی بیشتر روی تأثیر جیره‌های با کنسانتره زیاد بر مورفولوژی شکمبه متمرکز بود و درباره تأثیر استفاده از جیره‌های پرکنسانتره بر هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی بافت‌های روده‌های کوچک و بزرگ بره‌ها و نیز نقش افزودنی‌های تنظیم‌کننده pH بر این اثرات، مطالعات کمی انجام شده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی مقایسه‌ای اثرات بافر بی‌کربنات سدیم و ترکیب باکتری مصرف‌کننده اسید یعنی *مگا سفرا السدنی* و مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* (باکتری- مخمر) بر هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی بافت روده کوچک و بزرگ بره‌های عربی تغذیه شده با جیره‌های پر کنسانتره انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در مزرعه آموزشی- پژوهشی و آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. در آزمایش حاضر از ۱۸ رأس بره نر عربی ۱ ± ۹ ماه با وزن اولیه ۳/۵۵ ± ۳۲/۹۵ کیلوگرم استفاده شد. طول دوره آزمایش ۳۵ روز شامل ۱۴ روز دوره عادت‌پذیری و ۲۱ روز نمونه‌برداری بود. قبل از آغاز پژوهش، همه بره‌ها برای انگل‌های بیرونی (یک میلی‌لیتر آزانتول ۱۰ درصد در هفت لیتر آب به‌روش اسپری؛ شرکت بایر آلمان) و انگل‌های داخلی (تریکل ابندازول با لوامیزل، ۱۲ میلی‌لیتر برای هر بره؛ شرکت دارو پخش ایران) و برای مقابله با آنتروتوکسمی (سه میلی‌لیتر برای هر بره، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی- ایران) واکسینه شدند. بره‌ها در قفس‌های متابولیسمی (۱/۲ × ۱/۴ متر) نگهداری شدند.

بره‌ها به‌صورت تصادفی به‌یکی از سه تیمار شامل: ۱- جیره شاهد (فاقد افزودنی)، ۲- جیره شاهد + بافر بیکربنات سدیم (یک درصد جیره روزانه به‌صورت سرک)، ۳- جیره شاهد + مخلوط مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* (دو گرم در روز به‌ازای هر دام) به صورت محلول با باکتری *مگاسفرا السدنی* (سه میلی‌لیتر به‌ازای هر دام حاوی $4/5 \times 10^8$ cfu/ml در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر که هر روز صبح به هر دام خورانده می شد، اختصاص یافتند (DFM) (Sedighi and

.(Alipour, 2019; Khorasani *et al*., 2020

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه آزمایشی تغذیه شده به بره‌ها

Table 1- Feed ingredients and chemical composition of the experimental basal diet fed to lambs

اجزای جیره Components of diet	مقدار (گرم در کیلوگرم ماده خشک) Amounts (g/kg DM)
یونجه Alfalfa	201
کاه گندم Wheat straw	99
دانه جو Barley grain	300
دانه ذرت Corn grain	210
کنجاله سویا Soybeans meal	123.5
سبوس گندم Wheat bran	55
کربنات کلسیم Calcium carbonate	4
نمک Salt	2.5
مکمل ویتامین و مواد معدنی[۱] Vitamin and mineral supplements[1]	5
ترکیبات شیمیایی Chemical composition	
ماده خشک Dry matter	891
ماده آلی Organic matter	948
خاکستر Ash	51.7
پروتئین خام Crude protein	161
عصاره اتری Ether extract	27
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDFom[2]	290
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADFom[3]	165
متابولیسم انرژی (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) ME[4] (Mcal/kg DM)	2.65
کربوهیدرات‌های غیر فیبری Non–fiber carbohydrates[5]	470.3

[۱] هر کیلوگرم مکمل ویتامین – مواد معدنی حاوی ۵۰۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰هزار واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۰۰میلی‌گرم ویتامین E، ۱۸۰گرم کلسیم، ۶۰ هزار میلی‌گرم، فسفر، ۶۰ هزار میلی‌گرم سدیم، ۱۹هزار میلی‌گرم منیزیم، سه هزار میلی‌گرم روی، سه هزار میلی‌گرم آهن، ۱۹هزار میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم کروم، یک میلی‌گرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۴۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان.

[۲] NDF بدون خاکستر

[۳] ADF بدون خاکستر

[۴] محاسبه شده بر اساس ترکیب هر ماده خوراکی

[1] Premix contained (per kg): Vitamin A, 500,000 IU/mg; vitamin D3, 100000 IU/mg; vitamin E, 100 mg/kg; Ca, 180 g/kg; P, 60000 mg/kg; Na, 60000 mg/kg; Mg, 19000 mg/kg; Zn, 3000 mg/kg; Fe, 3000 mg/kg; Mn, 19000 mg/kg; Cu, 300 mg/kg; Co, 100 mg/kg; Se, 1 mg/kg; I, 100 mg/kg; antioxidant, 400 mg/kg; carrier, up to 1000 g.

[2] NDFom, ash-free neutral detergent fibre.

[3] ADFom, ash-free acid detergent fibre.

[4] Calculated from each feed ingredients.

[5] Calculated as: NFC=1000 – (NDFom g/kg + crude protein g/kg + ether extract g/kg + ash g/kg).

جدول ۲- اثر جیره‌های آزمایشی بر هیستومورفومتری بافت‌های روده کوچک بره‌ها

Table 2- The effect of experimental diets on histomorphometry of small intestinal tissues of lambs

متغیرها Variables	تیمارها Treatments			SEM	P-value
	Control[1]	Buffer[2]	Me+Sc[3]		
دئودونوم (میکرون) Duodenum (µm)					
ارتفاع پرز Villus height	560.00	562.50	482.50	20.616	0.2074
عمق کریپت Crypt depth	485.00	470.00	385.00	20.683	0.0916
عرض پرز Villus width	120.00	125.00	155.00	8.558	0.2054
ضخامت لایه عضلانی Thichness of tunica muscularis	262.50	247.50	270.00	18.600	0.3786
نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت Villus height to crypt depth ratio	1.16211	1.19741	1.25695	0.027	0.3721
مساحت پرز (میلی‌مترمربع) Villus surface (mm^2)	208.65	222.78	234.48	14.375	0.7974
ژوژنوم (میکرون) Jejunum (µm)					
ارتفاع پرز Villus height	575.00	705.00	600.00	31.571	0.2113
عمق کریپت Crypt depth	486.67	561.67	486.67	32.472	0.5815
عرض پرز Villus width	106.67	90.00	103.33	5.941	0.5077
ضخامت لایه عضلانی Thichness of tunica muscularis	268.33	253.33	286.67	11.950	0.5683
نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت Villus height to crypt depth ratio	1.1859	1.2783	1.3060	0.046	0.5638
مساحت پرز (میلی‌مترمربع) Villus surface (mm^2)	194.05	198.87	196.04	15.049	0.9924
ایلئوم (میکرون) Ileum (µm)					
ارتفاع پرز Villus height	653.33^a	430.00^b	445.00^b	29.841	0.0002
عمق کریپت Crypt depth	506.67^a	328.33^b	365.00^b	27.547	0.0101
عرض پرز Villus width	126.67	121.67	126.67	5.378	0.9183
ضخامت لایه عضلانی Thichness of tunica muscularis	223.33	188.33	191.67	13.709	0.0703
نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت Villus height to crypt depth ratio	1.3390	1.3670	1.2307	0.063	0.6782
مساحت پرز (میلی‌مترمربع) Villus surface (mm^2)	258.42^a	161.40^b	178.04^b	13.782	0.0023

[a,b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[۱] شاهد= فاقد هر گونه افزودنی

[۲] بافر= سدیم بی کربنات (یک درصد جیره روزانه)

[۳] *مگاسفرا السدنی* (سه میلی‌لیتر به‌ازای هر دام) + *ساکارومایسیس سرویسیه* (دو گرم به‌ازای هر دام)

[a,b] Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

[1] Control= without any supplementation

[2] Buffer= sodium bicarbonate supplementation (One percent daily ration)

[3] Me + Sc= *Megasphaera elsdenii* (Three milliliters per animal) + *Saccharomyces cerevisiae* (Two grams per animal)

شــرایط تغذیه و مدیریت پرورش بره‌های انتخاب شــده قبل از آزمایش یکسـان بود. جیره بره‌ها با اسـتفاده از جدول احتیاجات مواد مغذی نشـــخوارکنندگان کوچک (NRC, 2007) تنظیم شـــدند و به‌صـورت کاملاً مخلوط (TMR) به نسـبت ۳۰ درصـد علوفه و ۷۰ در صد کنسانتره در دو نوبت (ساعات ۸:۰۰ و ۱۶:۰۰) در حد اشتها به همراه دسترسی آزاد به آب در اختیار بره‌ها قرار گرفت (جدول ۱).

بافر بی‌کربنات سدیم مورد استفاده در پژوهش حاضر از شرکت کیمیا سپاهان (اصفهان-ایران) و مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* (7 × 10⁹ cfu/g) از شرکت خمیر مایه خوزستان (دزفول-ایران) تهیه شـد. باکتری‌های *مگاسـفرا السـدنی* از بز نجدی در دانشـگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان (ملاثانی- اهواز- ایران) جداسازی و تهیه شد (Mohammadabadi *et al*., 2018). مایع شکمبه سه سـاعت بعد از خوراک‌دهی صـبح، در هفته چهارم از طول دوره جهت تعیین pH توسـط لوله معدی از دام‌ها گرفته شـد، بخش رویی برای اطمینان از حذف بزاق دور ریخته شـــد و pH (pH متر دیجیتال، WTW مدل ۳۱۱۰، آلمان) آن اندازه‌گیری شـــد. در پایان آزمایش بره‌های هر تیمار کشتار شدند. پس از ذبح بلافاصله محوطه شکمی باز و دستگاه گوارش از ناحیه مری تا انتهای قولون جدا و خارج شد. جهت بررسـی‌های بافت‌شـناسـی روده‌ها، از بخش میانی سـه ناحیه دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم روده کوچـک و بخش میـانی روده بزرگ، قطعاتی به‌طول یک سـانتی‌متر جدا شـدند. هر یک از نمونه‌ها به‌طور جداگانه در ظروف درب بسته حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند (Garcia Diaz *et al*., 2018; Khorasani *et al*., 2021). پس از ۲۴ سـاعت فرمالین ظروف تعویض شـد و نمونه‌ها جهت بررسـی هیسـتومورفومتری و تغییرات بافتی به مرکز پاتولوژی دامپزشـکی اصـفهان منتقل شـدند. در آزمایشـگاه نمونه‌های بافتی با اسـتفاده از قالب‌های لوک هارت به‌صـورت عرضـی در پارافین قالب‌گیری و با کمک میکروتوم چرخان Sakura (مدل SRM 200 CW سـاخت چین) مقاطعی به ضـخامت پنج میکرومتر تهیه و با اسـتفاده از هماتوکسـیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شـدند (Wang *et al*., 2009; Khorasani *et al*., 2021) و تغییرات بافتی مورد بررسـی میکروسـکوپی قرار گرفت. اندازه‌گیری شـاخص‌های مورد مطالعه در بزرگ‌نمایی‌های مختلف با اسـتفاده از میکروسـکوپ Nikon (مدل YS100 ساخت ژاپن) با عدسی‌های مدرج و کالیبره شده انجام شد (در هر گروه سـه نمونه و از هر نمونه پنج برش بافتی و در هر برش بافتی حداقل چهار میدان میکروسکوپی شمارش و اندازه‌گیری شد). مطالعات میکرومتری در رابطه با بخش‌های مختلف روده کوچک طول، عمق، عرض پرز و ضـخامت لایه عضـلانی مورد بررسـی هیستومورفومتریک قرار گرفت.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصـادفی با سـه تیمار و چهار تکرار انجام شـد. همه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS (نسـخه ۹/۴) با مدل خطی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها تو سط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد انجام گرفت. از مدل آماری زیر استفاده شده است:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در این رابطه، Y_{ij}: مقدار مشاهده شده، μ: میانگین جامعه، T_i: اثر تیمار i‌ام و ε_{ij}: اثرات خطای آزمون است.

نتایج و بحث

هیسـتومورفومتری روده باریک: تأثیر تیمارهای بافر بی‌کربنات سدیم و باکتری- مخمر بر ساختار هیستومورفومتری بافت‌های روده کوچک در مقایسه با گروه شاهد در جدول ۲ آمده است.

اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشـی برای شـاخص‌های بافتی مورد مطالعه در بخش دوئودنوم وژژنوم مشاهده نشد. هر چند نسبت ارتفاع به عمق کریپت در تیمار دریافت‌کننده باکتری- مخمر از نظر عددی نسـبت به سـایر تیمارها بیشـتر بود (جدول ۲). در بخش ایلئوم ارتفاع پرز، عمق کریپت و مساحت پرز در شاهد نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵).

تأثیر اسیدهای چرب فرار بر تحریک تکثیر سلولی و رشد بافت دستگاه گوارش به پیش معده (شکمبه و نگاری) محدود نیست و بر تحریک تکثیر سـلولی و رشـد پرزهای روده کوچک نیز مؤثر اسـت (Wang *et al*., 2009). در روده کوچک به‌خصـوص ارتفاع پرزها، عمق کریپت و اندازه بافت پوشـشـی نقش قابل توجهی در مراحل نهایی هضم و جذب مواد مغذی از دستگاه گوارش دارند (Strusińska *et al*., 2009; Wang *et al*., 2009). در واقع هرچه ابعاد پرز بیشتر و پرز طویل‌تر باشد به‌دلیل وجود سلول‌های جاذب، توانایی جذب در آن‌ها افزایش می‌یابد (Attaix and Meslin, 1991). از طرفی، حضور و جذب اسـیدهای چرب فرار، کلید اصـلی توسـعه بافت‌های مجاری دستگاه گوارش می‌باشد (Attaix and Meslin, 1991; Vi *et al*., 2004). مطالعات مشـابهی در مورد اثر بافر شـیمیایی و یا اسـتفاده مستقیم از میکروب (DFM) در جیره پرکنسانتره بر بافت روده‌ها در حیوانات نشخوارکننده در دسترس نیست.

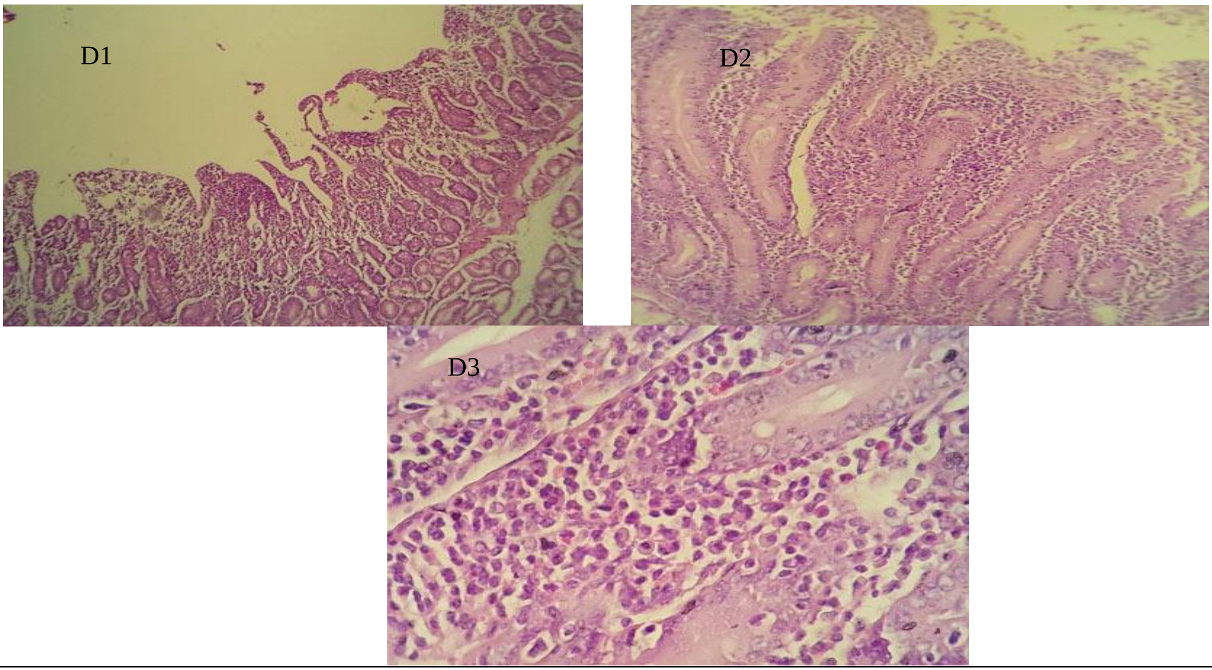
در آزمایش حاضر به‌دلیل مصرف جیره با کنسانتره زیاد و احتمالاً افزایش تولید اسـیدهای چرب فرار در شـکمبه (Khorasani *et al*., 2020) و انتقال آن‌ها به بخش‌های بعدی دسـتگاه گوارش، افزایش ارتفاع پرز، عمق کریپت و مسـاحت پرز در بخش‌های مختلف روده به‌خصوص در شاهد مشاهده شد؛ در واقع یکی از دلایل افزایش ارتفاع پرز و سـطح پرز در شـرایط اسیدوز افزایش ظرفیت جذب اسـیدهای چرب فرار و کمک به پایداری pH اسـت (Mashayekhi *et al*., 2020). بنابراین، کاهش این شاخص‌ها در تیمارهای دریافت‌کننده بافر

شـــیمیایی و باکتری- مخمر را می‌توانند نتیجه تأثیرات مثبت افزودنی‌های بافری و میکروبی نظیر بهبود pH مایع شـــکمبه (جدول ۳) منتقل شـده به بخش‌های مختلف روده، در نتیجه فعالیت بیشـتر باکتری‌های سلولولیتیک و تولید استات بیشتر دانست که باعث کنترل نسبی اسیدوز شاهد شده است (Lechartier and Peyraud, 2011; Mashayekhi *et al*., 2020; Khorasani *et al*., 2021).

افزایش نســبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در ســاختار روده‌ای مرتبط با هضـم و جذب بهتر مواد مغذی بوده، توانایی بالاتری را در تامین احتیاجات مواد مغذی ایجاد می‌کند (Afzalzadeh *et al*., 2013) بنابراین، بهبود نســـبت ارتفاع به عمق کریپت در دئودونوم و ژژنوم در تیمارهای دریافت‌کننده افزودنی‌های شـیمیایی و یا میکروبی را می‌توان از نتایج مثبت اسـتفاده از افزودنی‌های تنظیم‌کننده pH در آزمایش حاضـــر دانســـت؛ به‌طوری که در آزمایش های برخی از پژوهشگران با جوجه‌های گوشتی با مصرف مستقیم میکروب (DFM) نســبت ارتفاع به عمق کریپت در قســمت‌های مختلف روده کوچک بهبود یافت (Jayaraman *et al*., 2013; Lei *et al*., 2015) که با نتایج آزمایش حاضـــر مطابقت دارد. از طرفی، ســـرکوبی باکتری‌های بیماری‌زا توسط استفاده مستقیم میکروب و تعدیل میکروبی روده نیز ممکن اســت منجر به بهبود نسـبت ارتفاع پرز به عمق کریپت شــود (Lei *et al*., 2015).

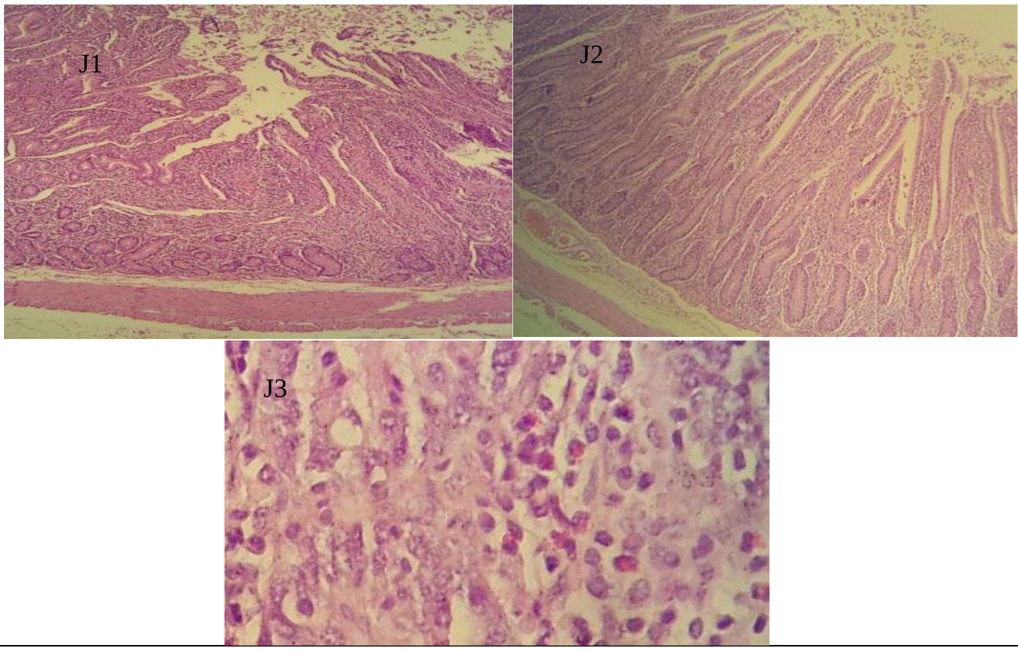
هیستوپاتولوژی روده کوچک و بزرگ

در بخش‌های مختلف روده (دئودونوم، ژژنوم و ایلئوم) در هر سـه تیمار التهاب مخاط روده به‌شکل نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اعم از لنفوسیت، پلاسما سل، با درجات متفاوت ائوزینوفیل مشاهده شـد. به‌علاوه، تغییرات پاتولوژیک به‌شـکل پرخونی، خونریزی، نکروز پرزها و بهم چسبیدن پرزها ناشی از التهاب و نفوذ سلول‌های التهابی مشاهده شد. به‌طور کلی، شدت التهاب بر پایه میزان نفوذ و گسترش سلول‌های التهابی در تیمارها به هم شبیه بودند.



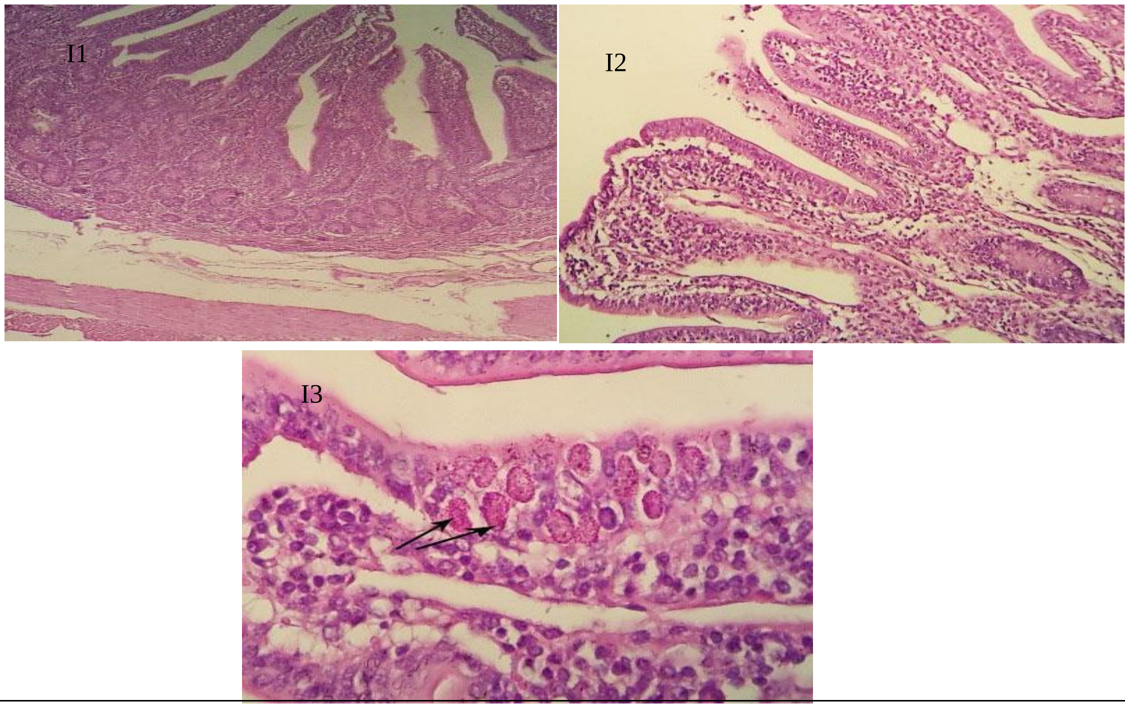
شکل ۱- دئودنوم (D)- D1, D2&D3: به هم چسبیدن رأس ویلی‌ها، نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و ائوزینوفیل‌ها در مخاط و پارین مخاط. D1& D2 با بزرگنمایی ۴۰ و D3 با بزرگنمایی ۱۰۰. رنگ‌آمیزی هماتوکسلین- ائوزین

Figure 1– Duodenum (D)- D1, D2 & D3: Sticking the heads of villuse together, Infiltration of mononuclear inflammatory cells and eosinophils in mucosa and submucosa. D1& D2: X40 and D3: X100. Hematoxylin-Eosin staining



شکل ۲- ژژنوم (J): J1, J2&J3: نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و ائوزینوفیل‌ها در مخاط و پارین مخاط. J1& J2: بزرگ‌نمایی ۴۰ و J3: بزرگ‌نمایی ۱۰۰. رنگ‌آمیزی هماتوکسلین- ائوزین

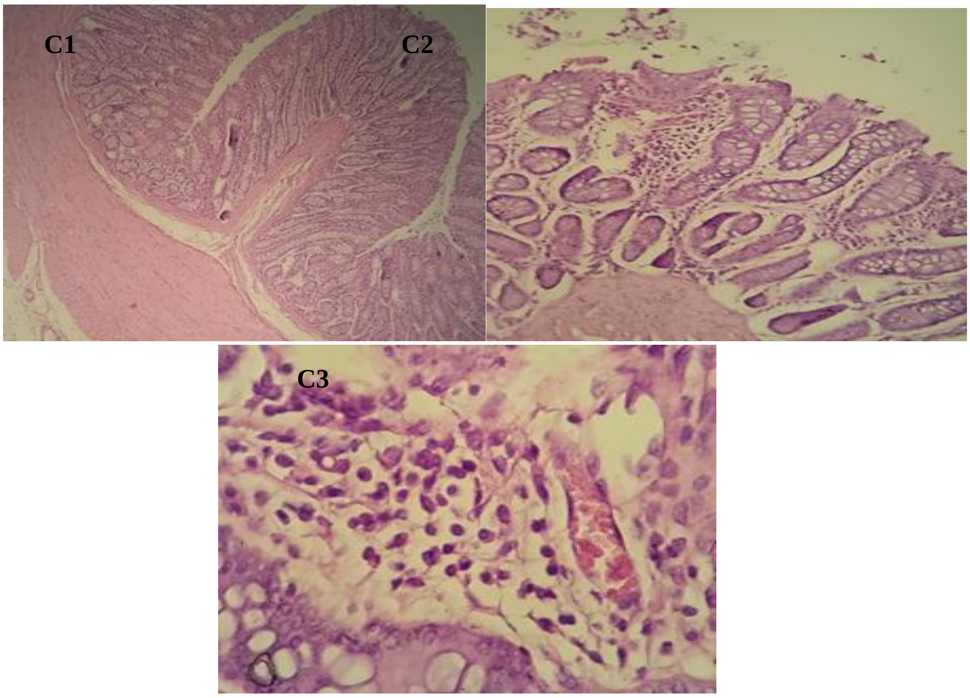
Figure 2- Jejunum (J): J1, J2 & J3: Infiltration of mononuclear inflammatory cells and eosinophils in mucosa and submucosa. J1& J2: X40 and J3: X100. Hematoxylin-Eosin staining



شکل ۳- ایلئوم (I): I1&I2: به هم چسبیدن ویلی‌ها، نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و ائوزینوفیل‌ها در مخاط، بزرگ‌نمایی ۴۰. I3: حضور فراوان ائوزینوفیل و وجود اووسیست‌های کوکسیدیا در محل فلش‌ها، بزرگ‌نمایی ۴۰۰. رنگ‌آمیزی هماتوکسلین- ائوزین

Figure 3- Ileum (I): I1& I2: Sticking villuse together, Infiltration of mononuclear inflammatory cells and eosinophils in mucosa, X40. I3: Abundant presence of eosinophils, Arrows: Existence of coccidial oocysts, X400. Hematoxylin-Eosin staining

در بخش ایلئوم در تمام تیمار ها پلاک های په یر (Peyer's patches) در زیر مخاط قابل مشـــاهده بودند. در ایلئوم در شـــاهد مقاطعی از انگل کوکسیدیا (فلش‌ها) در مخاط روده مشاهد شد که تا حدود زیادی می‌تواند حضـــور تعداد فراوان ائوزینوفیل‌ها را در مقاطع مختلف روده اعم از روده کوچک و روده بزرگ توجیه کند. هر چند در ســـایر بخش های روده در هیچ کدام از نمونه ها هیچ مقطعی از انگل مشاهده نشد.



شکل ٤– کولون (C):C1: نمایی کلی از مقطع روده بزرگ، بزرگ‌نمایی ۴۰. C2: نکروز رأس پرزها و نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در مخاط و در لابلای غدد لیبرکوهن، بزرگنمایی ۱۰۰. C3: حضور سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در مخاط و لابلای غدد لیبرکوهن، بزرگ‌نمایی ۴۰۰. رنگ‌آمیزی هماتوکسلین- ائوزین

Figure 4- Colon: C1: Complete cross section of the large intestine, X40. C2: Villi necrosis and infiltration of mononuclear inflammatory cells in the mucosa and among of the lieberkuhn glands, X100. Infiltration of mononuclear inflammatory cells in the mucosa and among of the lieberkuhn glands, X400. Hematoxylin-Eosin staining

جدول ۳– pH مایع شکمبه در بره‌های تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

Tables 3- Rumen fluid pH of lambs fed with diets

متغیر Variable	تیمارها Treatment			SEM	P-value
	Control[1]	Buffer[2]	Me + Sc[3]		
pH[4]	6.54^{b}	6.87^{a}	6.80^{a}	0.0654	0.0257

a,b میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

۱ شاهد= فاقد هر گونه افزودنی

۲ بافر= سدیم بی کربنات (یک درصد جیره روزانه)

۳ *مگاسفرا السدنی* (سه میلی‌لیتر به‌ازای هر دام) + *ساکارومایسیس سرویسیه* (دو گرم به‌ازای هر دام)

۴ ۳ ساعت پس از تغذیه صبحگاهی

a,b Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

1 Control= without any supplementation

2 Buffer= sodium bicarbonate supplementation (one percent daily ration)

3 Me + Sc= *Megasphaera elsdenii* (three milliliters per animal)+ *Saccharomyces cerevisiae* (two grams per animal)

4 3 hours after morning feeding

در روده بزرگ در شاهد پرخونی، نفوذ سلول‌های التهابی لنفوسیت، پلاسماسل و ائوزینوفیل به تعداد کم در پارین مخاط و لابلای غدد لیبرکوهن و همچنین نکروز رس پرز ها مشاهده گردید. در تیمار دریافت‌کننده بافر دژنراسیون پراکنده غدد لیبرکوهن همراه با نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و ائوزینوفیل‌ها در پارین مخاط و لابلای غدد لیبرکوهن مشاهد شد. در تیمار باکتری- مخمر نکروز غدد لیبرکوهن همراه با نفوذ سلول‌های التهابی با غالبیت ائوزینوفیل‌ها مشاهده شد.

در منابع، تاکنون پژوهش‌های مشابهی در خصوص هیستوپاتولوژی بخش‌های مختلف روده مشاهده نشد. به‌طور کلی، تغییرات ایجاد شده در بافت‌های روده جهت مقابله با التهاب‌های ایجاد شده است؛ در واقع اسیدوز شکمبه می‌تواند به بافت‌های پوششی شکمبه و روده آسیب برساند و منجر به انتقال باکتری‌های مسئول آبسه‌های کبدی شود (Odongo *et al.*, 2006; Khorasani *et al.*, 2021). در بیماری اسیدوز شکمبه به‌صورت تجربی با استفاده از تلقیح درون شکمبه‌ای دانه‌های خرد شده برنج، نفوذ نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک هسته‌ای به بافت شکمبه، نگاری، هزارلا و شیردان و پوسته پوسته شدن بافت پوششی دیواره شکمبه مشاهده شده است (Rose, 1989). در شرایط اسیدوز بافت پوششی برای باکتری‌ها و اندوتوکسین (لیپوپلی ساکاریدها-LPS) قابل نفوذ می‌باشد که پس از جابه‌جایی می‌تواند باعث آبسه‌های کبدی و التهاب شود (Mashayekhi *et al.*, 2020; Khorasani *et al.*, 2021). در واقع اسیدیته شکمبه منجر به مرگ باکتری‌های گرم منفی و به دنبال آن انتشار اندوتوکسین‌ها (LPS) و فعال کردن واسطه‌های التهابی و تأثیرگذاری بر عملکرد تولیدی حیوانات می‌شود (Garcia Diaz *et al.*, 2018). برخلاف نتایج آزمایش حاضر، در گاوهای تغذیه شده با کنسانتره بالا، استفاده از باکتری *مگاسفرا السدنی* ضایعات التهابی شکمبه را نسبت به شاهد کاهش داد (DeClerck *et al.*, 2020) همچنین در جیره با کنسانتره بالا در بره‌های پرواری با مصرف بافر و مخلوط باکتری *مگاسفرا السدنی* با مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* از میزان نفوذ سلول‌های التهابی در پارین مخاط کاسته شده است و شرایط بهتری و آرامش بیشتری در دام‌های مصرف‌کننده عوامل تنظیم‌کننده pH مشاهده شد (Khorasani *et al.*, 2021). دلیل اصلی و مشخص عدم مشاهده تفاوت‌ها بین شاهد و تیمارهای حاوی عوامل تنظیم‌کننده pH در بررسی پاتولوژی روده کوچک مشخص نشد، امّا شاید بتوان آن را به سن و تغذیه قبلی حیوان مرتبط دانست، به این معنی که تغذیه قبلی این بره‌ها تغییراتی را در بافت ایجاد کرده باشد (نظیر التهاب‌های مشاهده شده) که دیگر در مدت زمان کوتاه ترمیم نشوند. تحقیقات نشان می‌دهد که رژیم غذایی اولیه و تغذیه بر توسعه بافتی شکمبه و میکروفلورای آن تأثیر دارد و این تأثیرات ممکن است برای مدت طولانی ادامه داشته باشند و در نتیجه، بر عملکرد، طول عمر و سلامت نشخوارکنندگان بالغ تأثیر بگذارند. بر این اساس بیان شده است که برای توسعه شکمبه بهتر است که گوساله‌ها با غذای با کیفیت بالا و غنی از مواد فعال بیولوژیکی تغذیه شوند (Diao *et al.*, 2019). همچنین نشان داده شده که رژیم‌های غذایی می‌توانند فلور میکروبی در بره‌ها را در طول از شیر گرفتن تغییر دهند که این روند می‌تواند به‌مدت چهار تا پنج ماه ادامه یابد (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010; De Barbieri *et al.*, 2015). لذا، به نظر می‌رسد تغییرات پاتولوژیک و التهاب‌های مشاهده شده در بافت‌های مربوط به بره‌های شاهد؛ و عدم توانایی تیمارهای حاوی افزودنی‌های بافری شیمیایی و میکروبی برای بر طرف کردن آن‌ها، بیشتر ناشی از تأثیرات حاصل از سن و تغذیه قبلی دام‌های مورد آزمایش باشند که برگشت‌ناپذیر بوده و قابل جبران نیستند؛ بر این اساس پیشنهاد می‌شود که افزودنی‌های بیولوژیکی در جیره‌های با کنسانتره بالا از همان ابتدای از شیرگیری جهت توسعه بهتر بافت‌ها و اثرات مثبت آن‌ها استفاده و مورد بررسی قرار گیرند. به‌علاوه، برای مطالعات بافتی که در آن‌ها اثر جیره‌های پرکنسانتره مورد مطالعه قرار می‌گیرند، پیشنهاد می‌شود از دام‌هایی استفاده شود که قبل از شروع آزمایش با جیره‌ای بر پایه علوفه تغذیه شده باشند یا به‌طور کلی‌تر، با جیره‌هایی تغذیه شده باشند که استرس اسیدوز و در نتیجه، تخریب و آسیب سلول‌های روده‌ای را ایجاد نکنند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از افزودنی‌های بافری شیمیایی و یا میکروبی در آزمایش حاضر اگرچه باعث تأثیرات مثبتی بر هیستومورفومتری ایلئوم شد. با این حال، تأثیر مثبتی بر هیستومورفومتری دئودنوم و ژژنوم و نیز هیستوپاتولوژی روده کوچک و بزرگ مشاهده نشد و التهاب مخاط روده به‌شکل نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در همه تیمارهای مشاهده شد. در کل، بین عملکرد تیمار حاوی بافر بیکربنات با تیمار باکتری- مخمر از این نظرها تفاوتی مشاهده نشد و نتایج آن‌ها مشابه بود. برای تکمیل یافته‌ها، توصیه می‌شود که تأثیر افزودنی‌های تنظیم‌کننده pH (به‌ویژه نوع میکروبی)، در همین سطوح یا مقادیر متفاوت با آزمایش حاضر در سایر جیره‌ها از نظر مقدار کنسانتره و یا سایر دام‌ها با شرایط فیزیولوژیکی متفاوت بویژه مراحل اولیه رشد که فلور میکروبی به‌طور کامل استقرار پیدا نکرده است نیز مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. Afzalzadeh, A., Sharifi, S. D., Absalan, M., Khadem, A., & Ghandi, D. (2013). Effect of whole cottonseed feeding on feedlot performance and morphological characteristics of small intestine in Chaal male lambs. *Iranian Journal of Animal Science*, *43*(4), 457-464. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijas.2013.30266
2. Aschenbach, J. R., Zebeli, Q., Patra, A. K., Greco, G., Amasheh, S., & Penner, G. B., (2019). Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. *Journal of Dairy Science*, *102*(2), 1866-1882. 10.3168/jds.2018-15243
3. Attaix, D., & Meslin, J. C. (1991). Changes in small intestinal mucosa morphology and cell renewal in suckling, prolonged-suckling, and weaned lambs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *261*(4), 811-818. 10.1152/ajpregu.1991.261.4.R811
4. De Barbieri, I., Hegarty, R. S., Silveira C., Gulino, L. M., Oddy, V. H., Gilbert, R. A., Klieve, A. V., & Ouwerkerk, D. (2015). Programming rumen bacterial communities in newborn Merino lambs. *Small Ruminant Research*, *129*, 48–59. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.015.
5. DeClerck, J. C., Wade, Z. E., Reeves, N. R., Miller, M. F., Johnson, B. J., Ducharme, G. A., & Rathmann, R. J. (2020). Influence of *Megasphaera elsdenii* and feeding strategies on feedlot performance, compositional growth, and carcass parameters of early weaned, beef calves. *Translational Animal Science*, *4*(2), 863-75. https://doi.org/10.1093/tas/txaa031
6. Diao, Q., Zhang, R., & Fu, T. (2019). Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals*, *9*(8), 490. 10.3390/ani9080490
7. Erdman, R. A., Botts, R. L., Hemken, R.W. & Bull, L.S. (1980). Effect of dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. *Journal of Dairy Science*, *63*(6), 923-930. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83027-X
8. Garcia Diaz, T., Ferriani Branco, A., Jacovaci, F. A., Cabreira, C., Jobim Bolson, D. C., & Pratti Daniel, J. L. (2018). Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharides in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology. *PloS One*, *13*(2), e0193313. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193313
9. Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, *92*(2), 370-374. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02528
10. Khorasani, O., Chaji, M., & Baghban, F. (2020). Comparison of the effect of sodium bicarbonate buffer with *Megasphaera elsdenii* as a rumen-consuming acid on growth performance, digestibility, rumen and blood parameters of lambs in high concentrate. *Journal of Animal Science Researches*, *30*(2), 85-99. (In Persian).
11. Khorasani, O., Chaji, M., & Baghban, F. (2021). Effect of chemical buffer and *Megasphaera elsdenii*-yeast on histomorphometry and histopathology of rumen and liver of Arabian fattening lambs fed with concentrated diets. *Animal Production*, *23*(1), 47-59. (In Persian). https://doi.org/10.22059/jap.2021.307867.623553
12. Krause, K. M., & Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, *126*(3-4), 215-236. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004
13. Lechartier, C., & Peyraud, J. L. (2011). The effects of starch and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed forage proportion. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2440-2454. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3285
14. Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(2), 239-246. 10.5713/ajas.14.0330
15. Li, G. H., Ling, B. M., Qu, M. R., You, J. M., & Song, X. Z. (2011). Effects of several oligosaccharides on ruminal fermentation in sheep: an *in vitro* experiment. *Revue de Medecine Veterinaire*, *162*, 192-197.
16. Malekkhahi, M., Tahmasbi, A. M., Naserian, A. A., Danesh-Mesgaran, M., Kleen, J. L., Al-Zahal, O., & Ghaffari, M. H. (2016). Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, *213*, 29-43. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.12.018
17. Mashayekhi, M. R., Erfani-majd, N., Sari, M., & Rezaei, M. (2020). Investigating the effects of slow-release urea and molasses on histomorphometric tissue of rumen and abomasum and rumen fermentation parameters of fattening lamb. *Iranian Veterinary Journal*, *16*(1), 82-93. (In Persian). 10.22055/IVJ.2019.151750.2077
18. Mohammadabadi, T., Bakhtiari, M. A., & Alimirzaei, P. (2018). Isolation and identification of lactate-producing and utilizing bacteria from the rumen of najdi goats. *Indian Journal of Small Ruminants*, *24*(2), 276-280. 10.5958/0973-9718.2018.00056.9
19. NRC. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids.

National Academy Press Washington DC.
20. Odongo, N. E., AlZahal, O., Lindinger, M. I., Duffield, T. F., Valdes, E. V., Terrell, S. P., & McBride, B. W. (2006). Effects of mild heat stress and grain challenge on acid-base balance and rumen tissue histology in lambs. *Journal of Animal Science, 84*(2), 447-455. 10.2527/2006.842447x
21. Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J. P., Bayourthe, C., Auclair, E., & Newbold, C. J. (2013). The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PloS One*, *8*(7), e67824.
22. Prabhu, R., Altman, E., & Eiteman, M. A. (2012). Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*, 8564-8570. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067824
23. Rose, B. D. (1989). Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders, 3rd ed. Mc Grow Hill Inc. Singapore, 261-268: 478- 501
24. Sedighi, R., & Alipour, D. (2019). Assessment of probiotic effects of isolated *Megasphaera elsdenii* strains in Mehraban sheep and Holstein lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*, *248*, 126-131. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.007
25. Steele, M. A., Penner, G. B., & Chaucheyras-Durand, F. (2016). Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *Journal of Dairy Science, 99*(6), 4955-4966. 10.3168/jds.2015-10351
26. Stone, W.C. (2004). Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *87*, 13–26. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0
27. Strusińska, D., Minakowski, D., Bomba, G., Otrocka-Domagała, I., Wiśniewska, M., & Tywończuk, J. (2009). Effect of whole cereal grains contained in the ration on calf performance and selected morphometric parameters of the rumen and small intestine. *Czech Journal of Animal Science, 54*(12), 540-551. 10.17221/133/2009-CJAS
28. Vi, R. B., McLeod, K. R., Klotz, J. L., & Heitmann, R. N. (2004). Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science, 87*, 55-65. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70061-2
29. Wang, Y. H., Xu, M., Wang, F. N., Yu, Z. P., Yao, J. H., Zan, L. S., & Yang, F. X. (2009). Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Science, 122*(1), 48-52. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.07.024
30. Yáñez-Ruiz, D. R., Macías, B., Pinloche, E., & Newbold, C. J. (2010). The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiology Ecology*, *72*(2), 272–278. 10.1111/j.1574-6941.2010.00852.x